

# **AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS* EM *PONCIRUS TRIFOLIATA* CV RUBIDOUX E *CITRUS SUNKI***

THUANNY A. **BORGES**<sup>1</sup>; MARIÂNGELA C. **YALY**<sup>2</sup>; SAMANTA **MARENGO**<sup>3</sup>;  
FERNANDA N. **MAURÍCIO**<sup>4</sup>; MARCOS A. **MACHADO**<sup>5</sup>.

Nº 10139

## **Resumo**

O histórico da citricultura é assinalado por uma sucessão de doenças causadas por diferentes agentes etiológicos. O *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*), causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. é considerado a mais grave das doenças de citros. Embora a literatura relate a suscetibilidade de praticamente todas as espécies e variedades de citros ao HLB, o grupo dos trifoliatas (*Poncirus trifoliata* Raf.), incluindo seus híbridos, são considerados mais tolerantes. Aparentemente todas as espécies e variedades de citros são suscetíveis à bactéria do HLB, embora os sintomas não sejam típicos e uniformes para todas elas. A suscetibilidade ou resistência a um determinado patógeno é dada pela interação entre genes de patogenicidade e avirulência do patógeno com genes de resistência do hospedeiro. O entendimento dessa relação é crucial para o estabelecimento de abordagens de controle. Com o presente trabalho foi possível estudar a multiplicação da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* em *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*, confirmando a resistência da variedade *Poncirus trifoliata*.

## **Abstract**

The history of Brazilian citrus is marked by a succession of diseases caused by different etiological agents. The huanglongbing (HLB) or greening caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp. is considered the most serious diseases of citrus. Although the literature reports the susceptibility of virtually all species and varieties of citrus to the HLB, the group of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.), including their hybrids, are considered more tolerant. Apparently all species and varieties of citrus are susceptible to HLB bacterium, although the symptoms are not typical and uniform for all of them. The susceptibility or resistance to a particular pathogen is given by the interaction between genes for pathogenicity and virulence genes of the pathogen with genes of host resistance.

---

1. Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia, CCA/UFSCar, Araras-SP, ✉[thuannyborges@hotmail.com](mailto:thuannyborges@hotmail.com)

2. Orientador: Pesquisador, CENTRO APTA CITROS SYLVIO MOREIRA/IAC, Cordeirópolis-SP

3. Colaborador: Bolsista CNPq, CENTRO APTA CITROS SYLVIO MOREIRA/IAC, Cordeirópolis-SP

4. Colaborador: Bolsista CNPq, Graduação em Biotecnologia, CCA/UFSCar, Araras-SP

5. Colaborador: Pesquisador, CENTRO APTA CITROS SYLVIO MOREIRA/IAC, Cordeirópolis-SP

Understanding this relationship is crucial for the establishment of approaches to control. With this work we studied the multiplication of *C. Liberibacter asiaticus* *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki*, confirming the resistance of *Poncirus trifoliata* variety.

## **Introdução**

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. O país é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (AZEVEDO, 2010).

O HLB é considerado uma das mais devastadoras doenças de citros de todo o mundo. Até então restrita a países da Ásia e da África, a doença teve seu agente causal recentemente identificado no Estado de São Paulo (COLETTA FILHO *et al.*, 2004).

A doença é de particular importância para a citricultura brasileira, pois além de causar consideráveis e irreversíveis danos a praticamente todas as variedades de citros, encontra-se no país um dos seus principais vetores, a espécie de psílídeo *Diaphorina citri*. As duas principais formas de disseminação da doença são a transmissão através deste vetor (*D. citri*), o que torna o controle da doença ainda mais difícil, e material vegetativo contaminado (borbulhas e mudas).

O HLB se caracteriza por uma série de sintomas que são basicamente representados pela ocorrência de folhas jovens com sinais de deficiência de Zn, Ca, B e Mn, frutos com tamanho reduzido e assimétrico, columela central torta, abortamento de sementes e coloração desuniforme com predomínio da cor verde na face voltada para o interior da planta. A planta apresenta redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos e seca dos ramos a partir da extremidade. Plantas infectadas com HLB apresentam morte econômica (= incapacidade de produção econômica) em curto espaço de tempo e morte biológica com ataque severo da bactéria. Os sintomas das frutas encontradas no Brasil são mais semelhantes aos observados na China do que na África do Sul (BOVÉ, 2006).

Aparentemente todas as espécies e variedades de citros são suscetíveis à bactéria do HLB, embora os sintomas não sejam típicos e uniformes para todas elas. A suscetibilidade ou resistência a um determinado patógeno é dada pela interação entre genes de patogenicidade e avirulência do patógeno com genes de resistência do

hospedeiro. O entendimento dessa relação é crucial para o estabelecimento de abordagens de controle.

O patossistema HLB (planta-patógeno-vetor-ambiente) ainda é muito pouco conhecido. O controle da doença em todo o mundo se dá por erradicação de plantas doentes e controle químico do vetor.

Recentemente, um trabalho desenvolvido por MARENGO (2009) relatou que os resultados obtidos por RTqPCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Quantitativo em Tempo Real) indicam que existe diferença na multiplicação da bactéria entre tangerina Sunki e o *Poncirus*, sendo que a bactéria se multiplica mais rapidamente na tangerina. No *Poncirus*, a bactéria se multiplica lentamente até certo ponto e depois a multiplicação começa a decair.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a multiplicação da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*, através da técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real, por um período de um ano, em *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*, visando confirmar se o *Poncirus trifoliata* continua mais resistente à multiplicação da bactéria.

## **Material e Métodos**

Foram utilizadas doze plantas de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux, somando-se vinte e quatro plantas, sendo essas anteriormente enxertadas sobre citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*). As plantas foram posteriormente sobre-enxertadas com duas borbulhas provenientes de plantas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com fotoperíodo natural e temperatura de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ . As plantas foram coletadas por um período de um ano para avaliar a multiplicação da *Ca. Liberibacter asiaticus*. As coletas foram realizadas mensalmente, o DNA total foi extraído de cada amostra e foram realizadas as reações em cadeia da polimerase (PCR convencional). Inicialmente, seria utilizado o sistema Taqman, conforme descrito no Projeto, entretanto, a sonda não funcionou e não ocorria amplificação mesmo no controle positivo.

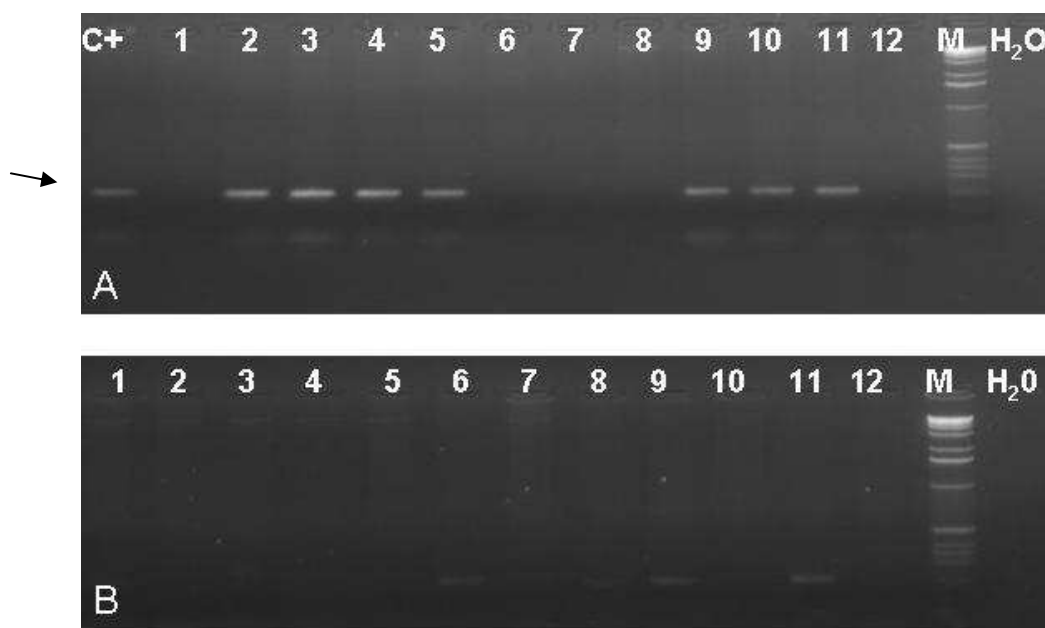
Para todas as coletas seguiram-se os seguintes passos: maceração das amostras com nitrogênio líquido; extração do DNA de acordo com a metodologia descrita por MURRAY & THOMPSON (1980), com adaptações introduzidas por MACHADO et al., 1996; eletroforese em gel de agarose 1% para comprovação da extração do DNA.

As Reações em Cadeia da Polimerase para o diagnóstico do HLB foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por COLETTA FILHO & CARLOS (2010).

## Resultados e Discussão

As coletas foram iniciadas três meses após as plantas terem sofrido uma poda. Nas primeiras coletas, as plantas não apresentavam sintomas e doze plantas de tangerina Sunki e sete de *Poncirus trifoliata* foram positivas para a presença de *Ca Liberibacter asiaticus* por PCR convencional. Após a oitava coleta observou-se que as plantas de Sunki continuavam positivas e que o número de plantas positivas de *Poncirus trifoliata* para HLB foi decaindo (Figura 1). Após seis meses da realização da poda, as plantas da variedade Sunki começaram a apresentar sintomas (Figura 2), entretanto, alguns sintomas foram observado nas plantas de *Poncirus trifoliata* somente após doze meses da realização da poda .

Segundo BOSCARIOL et al. (2010), uma redução na concentração da bactéria foi observada nos gêneros *Atalantia*, *Poncirus*, *Eremolemon* e *Microcitrus*. Sendo que, foi possível confirmar que multiplicação da bactéria é uma característica contrastante entre as espécies de citros



**FIGURA 1.** Diagnóstico para *Ca Liberibacter asiaticus* por PCR. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular (Ladder de 1Kb), C+ controle positivo, H<sub>2</sub>O=água. As bandas evidenciam quais amostras estão infectadas. (A) 1-12 amostras de *Poncirus trifoliata* na quarta coleta e (B) 1-12 amostras de *Poncirus trifoliata* na oitava coleta.



**FIGURA 2.** Padrão de sintomas nas folhas de tangerina Sunki (A e B) e *P. trifoliata* (C) infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*.

## Conclusão

Com o presente trabalho foi observado que a variedade *Poncirus trifoliata* apresentou uma taxa de infecção e multiplicação menor da bactéria, sugerindo uma maior resistência ao *huanglongbing* (HLB) em relação à variedade *Citrus sunki*, confirmando o trabalho desenvolvido por MARENGO (2009).

## Referências Bibliográficas

- AZEVEDO, C. L. L. **Sistema de produção de Citrus para o nordeste:** Importância econômica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>>. Acesso em: 01 jul. 2010.
- BOSCARIOL-CAMARGO, R.L., CRISTOFANI-YALY, M., MALOSSO, A., COLETTA FILHO, H.D., MACHADO, M.A. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.85-90, 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p.7- 37, 2006.
- COLETTA FILHO, H.D., CARLOS, E.F. Ferramentas para diagnóstico de huanglongbing e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.2, p. 129-143, 2010.
- COLETTA-FILHO, H. D., TARGON, M. L. P. N., TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JR., J., DO AMARAL, A. M., MULLER, G. W., MACHADO, M. A. First

- Report of the Causal Agent of Huanglongbing ("*Candidatus* Liberibacter asiaticus") in Brazil. **Plant Disease**, v.88, p.1382, 2004.
- MACHADO, M.A., COLETTA FILHO, H.D., TARGON, M.L.N., POMPEU, JR. J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica** 92: 321-326, 1996.
- MARENGO, S. Mapeamento genético de tangerina Sunki e Poncirus trifoliata para resistência ao *huanglongbing* (greening) dos citros. 2009. 75p. Dissertação (Mestrado) Instituto Agronômico de Campinas.
- MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research** 8: 4321-25, 1980.